

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2016

Rita Ruohola

SOLUJEN VIABILITEETTI VAAHTOMAISISSA BIOMATERIAALEISSA

Rita Ruohola

SOLUJEN VIABILITEETTI VAAHTOMAISISSA BIOMATERIAALEISSA

Biomateriaaleja käytetään kudosteknologissa kasvatusalustana soluille, tarkoituksena tarjota soluille autenttisempi, kudoksenkaltainen kolmiulotteinen mikroympäristö. Hydrogeelivaahtojen käyttämisellä solujen kasvumatriisina on tarkoitus simuloida *in vivo*-ympäristöä ja näin antaa luotettavampaa tutkimustietoa *in vitro*-tutkimuksissa.

Hydrogeelit ovat kolmiulotteisia polymeeriverkkoja, joiden korkea vesipitoisuus ja taipuisuus tekevät niistä hyvin biomateriaalikäyttöön sopivan, sillä ne muistuttavat suuresti luonnollisen kudoksen ekstrasellulaarista, eli solunulkoista ainetta. Hydrogeelejä on käytetty erityisesti pehmytkudosten hoidossa, mutta niiden soveltuvuutta myös kovakudosten hoitoon tutkitaan.

Opinnäytetyössä tutkittiin silikapohjaisia hydrogeelivaahtoja ja niiden käyttöä solujen viabiliteettia ylläpitävänä matriisina. Tavoitteena oli toistaa solukasvatus jo aiemmin tutkitulla hydrogeelivaahdolla, sekä testata uutta hydrogeelivaahtoa, jonka kuiva-ainepitoisuus oli pienempi kuin aiemmin käytetyillä. Vaahtojen rakennetta ja niihin implementoitujen solujen viabiliteettia tutkittiin noin kuukauden mittaisella ajanjaksolla.

Solujen viabiliteettia kaikissa materiaaleissa seurattiin 30 vuorokautta ja materiaalin reologisia ominaisuuksia 21 vuorokautta. Viabiliteetista ainoat positiiviset tulokset saatiin korkeamman kuiva-ainepitoisuuden sisältävistä hydrogeelivaahdoista. Materiaalien muutoksia mitattiin useissa aikapisteissä. Mittausten perusteella voidaan todeta, että korkeamman silikamäärän sisältävästä soolista valmistettujen hydrogeelivaahtojen varastomoduli pysyi lähes samana koko seurantajakson ajan, mutta häviömoduuli nousi hieman. Vastaavasti hydrogeelivaahtojen, jotka oli valmistettu vähemmän silikaa sisältävästä soolista, varastomoduli nousi seurannan aikana, kun taas häviömoduuli laski. Vaahtoissa ei tapahtunut silmin havaittavaa muutosta seurantajakson aikana.

ASIASANAT:

3D-solukasvatus, biomateriaalit, hydrogeelit, kudosteknologia, nisäkässolut

Rita Ruohola

CELL VIABILITY IN FOAM-LIKE BIOMATERIALS

Biomaterials are used in tissue engineering as a platform for cell culturing in order to provide a more authentic, tissue-like three dimensional microenvironment for the cells. The use of hydrogel foams as a culture matrix aims to simulate an *in vivo* environment and thus provide more reliable results in *in vitro* studies.

Hydrogels are three-dimensional polymer networks which have a high water content, are very flexible and resemble a natural extracellular environment. They are thus well suited for purpose for biomaterial use. Hydrogels have been used for regeneration of soft tissues but their applicability for hard tissue regeneration is under research.

In this Bachelor's Thesis the main focus was on silica based hydrogel foams and their use as a growth and viability supporting material for cells. The aim was to replicate a previous study conducted within the same project. In the research cell growth and survival was tested in a hydrogel foam from an earlier study and in a new foam which contained less dry matter than the previous ones. The structure of the foams and the viability of the cells were tested during a time period equivalent of approximately one month.

The viability of the cells was measured for 30 days and the rheological features were monitored for 21 days. The only positive viability results were got at hydrogel foams with higher dry-matter content. The changes in the material were measured at many different time points, although the volume of the materials was limited. According to the measurements the hydrogel foams prepared from silica sols of higher solid content exhibited little change in storage modulus whereas the loss modulus showed a modest increase. Correspondingly the hydrogel foams based on silica sols of lower solid content had an increase in storage modulus and a decrease in loss modulus. The foams exhibited no visible change in foam structure during the follow-up period.

KEYWORDS:

3D cell culture, biomaterials, hydrogels, mammalian cells, tissue engineering

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 BIOMATERIAALIT KUDOSTEKNOLOGIASSA	8
2.1 Yleisesti kudosteknologiasta	8
2.2 Hydrogeelit	9
2.3 Silika biomateriaaleissa ja hydrogeeleissä	10
3 SOLUVILJELY	11
3.1 WEHI-164	11
3.2 3D-solukasvatus	12
4 REOLOGIA JA ELASTINEN MODUULI	13
4.1 Elastiset ominaisuudet oskilaatiomittauksissa	13
4.2 Youngin moduuli	13
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	15
5.1 Silikamatriisin valmistus	15
5.2 Vaahtojen valmistus	16
5.3 Solujen lisääminen biomateriaalille	17
5.4 Vaahtonäytteet ja niiden tutkiminen	18
5.5 Solujen viabiliteetti	19
5.6 Reologiset mittaukset	20
6 TULOKSET	22
6.1 Solujen viabiliteetti	22
6.2 Reologiset mittaukset	26
7 POHDINTA	33
8 JOHTOPÄÄTÖKSET	36
LÄHTEET	37

LIITTEET

- Liite 1. Työssä käytetyt soolit
- Liite 2. Soolin valmistusprosessi
- Liite 3. Hydrogeelivaahtojen valmistusprosessi
- Liite 4. Käytetyt liuokset

KUVAT

- | | |
|--|----|
| Kuva 1. Vaahtonäytteiden ottaminen laminaarikaapissa | 19 |
| Kuva 2. AlamarBlue® silikavaahdoissa ja solususpensiossa | 20 |

KUVIOT

- | | |
|---|----|
| Kuvio 1. Silikan määrä soolissa ja R-arvon määräytyminen. | 15 |
| Kuvio 2. Viabiliteettinäytteiden fluoresenssi seurantajaksolla | 26 |
| Kuvio 3. Hydrogeelivaahtojen häviömoduuli seurantajakson alussa. | 27 |
| Kuvio 4. Hydrogeelivaahtojen häviömoduuli seurantajakson lopussa. | 28 |
| Kuvio 5. Hydrogeelivaahtojen varastomoduuli seurantajakson alussa. | 28 |
| Kuvio 6. Hydrogeelivaahtojen varastomoduuli seurantajakson lopussa. | 29 |
| Kuvio 7. R50-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon varasto- ja häviömoduuli seurantajakson aikana. | 30 |
| Kuvio 8. R50-soolista valmistetun vaahdon häviötekijä seurantajaksolla. | 31 |
| Kuvio 9. R90-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon varasto- ja häviömoduuli seurantajakson aikana. | 31 |
| Kuvio 10. R90-soolista valmistetun vaahdon häviötekijä seuranta jaksolla. | 32 |
| Kuvio 11. Hydrogeelivaahtojen varastomoduuli aiemmassa tutkimuksessa. | 34 |
| Kuvio 12. Hydrogeelivaahtojen häviömoduuli aiemmassa tutkimuksessa. | 35 |

TAULUKOT

- | | |
|---|----|
| Taulukko 2. Ihmisen eri kudosten elastisia moduuleja. | 14 |
| Taulukko 1. Sooli-medium -suhde vaahdoissa sekä solumäärät | 17 |
| Taulukko 3. Hydrogeelivaahdoilta tehdyt reologisetmittaukset. | 21 |
| Taulukko 4. Hydrogeelivaahdot. | 22 |
| Taulukko 5. Fluoresenssimittaukset, hydrogeelivaahto 1 ja 2. | 23 |
| Taulukko 6. Fluoresenssimittaukset, hydrogeelivaahto 3 ja 4. | 24 |
| Taulukko 7. Fluoresenssimittaukset, hydrogeelivaahto 5 ja 6. | 25 |
| Taulukko 8. Fluoresenssimittaukset, hydrogeelivaahto 7 ja 8. | 25 |

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys (Lähdeviite)
Eukaryootti	Aitotumallinen
FBS	Fetal Bovine Serum, naudansikiöseerumi
HCl	Vetykloridihappo, suolahappo
<i>In vitro</i>	Koeputkessa, tai muulla alustalla, elävän organismin ulkopuolella
<i>In vivo</i>	Elävän organismin sisällä
NaOH	Natriumhydroksidi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute –soluviljelymedium
Scaffold	Tukiranka, solumatriisi
TEOS	Tetraetyyliortosilikaatti
WEHI-164	Solulinja hiiren fibroblasteista

1 JOHDANTO

Opinnäytetyössä tutkittiin silikapohjaisia hydrogeelivaahoja, joita käytettiin kasvatusmatriisina nisäkässoluille. Vaahtojen tarkoituksena oli toimia kasvua ylläpitävänä 3D-kasvualustana ja tarjota soluille tavallista, yhdessä tasossa tapahtuvaa kasvatusta autenttisempi mikroympäristö. Hydrogeelit tarjoavat potentiaalisen materiaalin erityisesti pehmytkudosten regeneraatioon, mutta niitä on käytetty myös kovakudosten hoidossa. (Billiet, 2012)

Tässä opinnäytetyössä oli tavoitteena testata kahden erilaisen hydrogeelivaahdon käyttöä kasvatusalustana nisäkässoluille, sekä ylläpitää niiden kasvua ja viabiliteettia kuu-kauden ajan. Työn aikana seurattiin lisäksi materiaalin kehitystä ja muutoksia reologisilla mittauksilla.

Työssä tutkitut materiaalit valmistettiin kaksivaiheisella sooli-geelimenetelmällä, jonka ensimmäisessä vaiheessa valmistettiin silikasooli. Silikasooli on pH-arvoltaan hapanta ja kun se nostetaan natriumhydroksidia sisältävällä medium-emäsluoksella lähelle neutraalia, soolin geelitymisreaktiot ja aggregoituminen kiihtyvät ja lopulta muodostuu geeli. Kun soolia vaahdotetaan medium-emäsluoksen lisäämisen jälkeen, mutta ennen sen geelipisteen saavuttamista, saadaan aikaan hydrogeelivaaho. Hydrogeelivaahdon huokoskoko on suurempi kuin vaahdottomalla hydrogeelillä. Huokoskoko on yksi tärkeimmistä parametreista 3D-matriiseissa.

Opinnäytetyö tehtiin Turun Ammattikorkeakoulun Biomateriaalit ja diagnostiikka -tutkimusryhmän projektissa, jonka tavoitteena on kehittää solukapselointiin sopiva hydrogeeleihin pohjautuva biomateriaali. Työssä tutkitusta hydrogeelivaahdoista on tarkoitus kehittää injektoitava, terapeuttinen valmiste 3D-soluviljelyn ja kudosteknologian tarpeisiin.

2 BIOMATERIAALIT KUDOSTEKNOLOGIASSA

Terveysthuollossa käytettävillä biomateriaalilla tarkoitetaan joko synteettistä tai eloperäistä tuotetta tai materiaalia, joka on kontaktissa elävän kudoksen, veren tai kudoksetien kanssa. Yleisesti biomateriaalit voidaan jakaa kemiallisen koostumuksen perusteella metalleihin, polymeereihin, keraameihin, komposiitteihin ja biologista alkuperää oleviin materiaaleihin. (Törmälä et al. 2003) Biomateriaaleja käytetään korjaamaan, hoitamaan tai korvaamaan vaurioituneita tai toimimattomia kudoksia. (Bourg & Amaury 2010)

Biomateriaaleilla on useita eri käyttötarkoituksia. Tyypillisiä käyttökohteita ovat mm. erilaiset tuki- ja liikuntaelinproteesit, biohajoavat implantit sekä erilaiset kudosten ja elinten osien proteesit, kuten sydänläppä- tai verisuoniproteesit. (Törmälä et al. 2003) Biomateriaaleista valmistettuja implantteja tai scaffoldjeja käytetään myös soluterapiassa, jossa sopiva biomateriaali toimii tukirankana soluille. (Hinderera et al. 2016) Biomateriaaleille on tärkeää olla bioyhteensopivia kehon ja sen toimintojen kanssa. Materiaaleilta vaaditaan hyvin erilaisia ominaisuuksia kehon eri alueilla. (Bourg & Amaury 2010)

2.1 Yleisesti kudosteknologiasta

Kudosteknologian päätavoitteena on vaurioituneen kudoksen uusiminen eli regeneraatio. Kudosteknologialla pyritään pääsemään eroon erilaisten proteesien ja implanttien käytöstä, sillä vaikka ne ovat toimivia hoitomuotoja, ne eivät koskaan korvaa eheän ja toimivan kudoksen ominaisuuksia koska ne voivat vaurioitua, lakata toimimasta tai keho voi alkaa hylkimään niitä pitkällä aikavälillä.

Potilaan omasta kudoksesta valmistettavat siirännäiset ovat biologisesti yhteensopivia, mutta ääritapauksissa, kuten laajojen palovammojen hoidossa, kudostamateriaalia ei välttämättä ole riittävästi tehokkaaseen hoitoon. Vakavasti loukkaantuneita tai sairaita potilaita ei myöskään voida aina hoitaa luovuttajilta saaduilla kudossiirännäisillä, sillä mahdolliset vastereaktiot voivat olla potilaan kannalta kohtalokkaita. (Bourg & Amaury 2010)

Kokonaisten elinten siirroissa on usein haasteellista löytää sopivaa luovuttajaa ja elinsiirtojen odotusajat ovat erittäin pitkiä. Esimerkiksi Yhdysvalloissa oli vuonna 2005, so-

pivia maksan luovuttajia yksi neljää potilasta kohden. Tällöinkin keho saattaa alkaa hylkiä siirrettyä elintä, hylkimistä estävästä lääkityksestä huolimatta. Luovutetut elimet ovat myös potentiaalisia infektiolähteitä. (Bourg & Amaury 2010)

Kudosteknologian voidaan ajatella yhdistävän useita eri tieteenalvoja, kuten esimerkiksi solubiologiaa, proteiini-kemian, biomateriaalitekniikkaa ja kirurgiaa. (Brown, 2013) (Brown 2013) Esimerkkinä kudosteknologisesta sovelluksesta ovat erilaiset biopolymeerit, joita voidaan käyttää mm. lääkeimplanteissa ja tukirankana soluille sekä *in-vivo* että *in-vitro* käytössä. (Salermo & Pascual 2014)

2.2 Hydrogeelit

Hydrogeelit ovat tärkeä osa biolääkinnällisiä sovelluksia, sillä niiden vaikutuksia soluihin ja kudoksiin voidaan kemiallisesti muokata toivotunlaiseksi. Hydrogeelien taipuisuus ja korkea vesipitoisuus tekevät niistä luonnollisen kudoksen kaltaisen ja hyvin biomateriaalitarkoituksiin sopivan. (Rimmer 2011)

Hydrogeelien valmistuksessa voidaan käyttää luonnollisia tai synteettisiä polymeerejä, ja niiden käyttö solukapseloinnissa on herättänyt suurta kiinnostusta. Viimeisen vuosikymmenen aikana niiden käyttöä erityisesti elinten ja kudosten korjaamisessa on tutkittu paljon. (Billiet 2012)

Hydrogeelit ovat kolmiulotteisia polymeeriverkkoja, joilla on kyky absorboida suuria määriä vettä tai biologisia nesteitä. Hydrogeeleissä esiintyvät hydrofiiliset ryhmät kuten -OH, -CONH, -CONH₂, ja -SO₃H, aiheuttavat ristisidoksen polymeeriketjujen välille ja näin aikaansaavat hydrogeelin muodostumisen. Hydrogeelien kyky absorboida nesteitä, sen sijaan että ne liukenisivat, on erittäin tärkeä ja uniikki ominaisuus, jota voidaan hyödyntää esimerkiksi lääkeannosteluun tarkoitetuissa materiaaleissa. Muita hydrogeelien etuja ovat mm. joustavuus, muunneltavuus ja biologinen yhteensopivuus. (Tiwari et al. 2012)

Hydrogeelien heikkoutena pidetään niiden vähäistä mekaanisen rasituksen kestävyttä, siksi niitä on käytetty ensisijaisesti pehmytkudosten hoidossa, mutta niiden käyttöä kovakudosten hoidossa tutkitaan. (Billiet 2012) Hydrogeelejä voi valmistaa myös keraamisista materiaaleista, esim. silikasta (SiO₂).

2.3 Silika biomateriaaleissa ja hydrogeeleissä

Silika on monikäyttöinen materiaali, joka voi esiintyä useissa eri muodoissa. Silika on veteen liukeneva ja se pystyy sitomaan eri määriä vettä. Erityisesti sooli-geeli-prosessissa valmistettu amorfinen silika voidaan saada liukenemaan erittäin vaihteleviin määriin vettä, jopa siinä pH-arvossa jossa silikan liukeneminen on pienimmillään.

Silikan kiinnostavin ominaisuus on sen vuorovaikutus elävien organismien ja biomolekyylien kanssa. Erityisesti amorfisen silikan on havaittu vaikuttavan positiivisesti eläviin organismeihin. (Jokinen et al. 2010)

Silikaa esiintyy luonnossa melko yleisesti ja moni organismi pystyy tuottamaan niin kutsuttua biosilikaa. Biosilika on rakenteellisesti erittäin kestävä ja sillä on ainutlaatuisia kemiallisia ja optisia ominaisuuksia. Biosilikan pinnassa on useita erilaisia funktionaalisia ryhmiä, joiden ansiosta se soveltuu proteiiniadsorptioon sekä entsyymien stabilointiin. Biosilikaan kiinnitetyt biomolekyylit ovat suojassa kemialliselta denaturoitumiselta, sekä erilaisilta proteaaseilta. (Tiwari et al. 2012)

Yksi tutkituimmista silikan valmistusmenetelmistä on nimenomaan mainittu sooli-geeli-menetelmä. Siinä sekä valmistusprosessi että valmiin silikan rakenne muistuttavat läheisesti luonnossa muodostuvaa silikaa. Sooli-geeliprosessi tapahtuu nestefaasissa, jolloin siitä saatava silika on käytettävissä moniin eri sovelluksiin. (Jokinen et al. 2010)

Geelien valmistukseen käytettävä silikasooli on usein pH-arvoltaan alle neutraalin pH:n. Geelin muodostumisessa nanokokoiset partikkelit aggregoituvat liuoksessa ja nämä aggregaatit muodostavat geelin. Aggregoitumista voi nopeuttaa nostamalla liuoksen pH:ta. pH:n nostamisen yhteydessä voidaan sooliin lisätä nesteitä, jolloin geeliytymisprosessi hidastuu ja se tapahtuu hallitummin. Korkeampi pH-arvo on tärkeä myös, jos geeliin halutaan kapseloida matallalle pH:lle herkkiä komponentteja, kuten proteiineja. (Jokinen et al. 2010)

3 SOLUVILJELY

Soluviljelyllä tarkoitetaan usein erityisesti eukaryoottisten solulinjojen kasvatusta laboratorio-olosuhteissa. Soluviljelyn ajatellaan yleensä tapahtuvan kaksisolotteisessa ympäristössä, jossa solut kasvavat yhdessä kerroksessa, esimerkiksi kasvatusmaljalla tai soluviljelyyn tarkoitettussa T-pullossa.

Soluviljelyn fysiologisten ominaisuuksien vastaavuutta *in-vivo*-olosuhteisiin verrattuna on pitkään pidetty ongelmana. Soluviljelyssä solujen monet ominaisuudet eivät tule esiin samoin kuin ne tulisivat luonnollisessa kudoksessa, sillä solujen, sekä solujen ja soluväliaineen välinen vuorovaikutus puuttuu. Vastaavuuseroja aiheuttaa myös solulinjoille tyypillinen homogeenisyys, verrattuna kudoksen heterogeeniseen solu-ympäristöön, sekä erot hormoni- ja ravintoympäristössä. (Freshney 2000)

Solulinjoja voidaan jaotella eri tavoin. Tyypillisesti ne jaetaan joko jakautumis- tai kasvutavan mukaan. Jakautumistavalla eroteltuna solut voivat olla joko primaarisia- tai jatkuvia solulinjoja. Normaalisti solut voivat jakautua vain rajallisen määrän kertoja. Tämän vuoksi suoraan kudoksesta erotetut primaariset solulinjat ovat lyhytikäisiä. Primaariset solulinjat eivät myöskään ole homogeenisiä johtuen juuri siitä, että ne on eristetty kudoksesta.

Jatkuvia solulinjoja on kahdenlaisia; Linjoilla on joko tietty määrä jakautumiskertoja, tai ne jakautuvat loputtomasti. Solulinjan päättymiseen tai sen loputtomaan jatkumiseen vaikuttavat solun kromosomissa olevat telomeerit. Telomeerit ovat kromosomin päissä olevat DNA-jaksot, jotka kuluvat joka solunjakautumisessa. Loputtomasti jakaantuvilla solulinjoilla nämä telomeerit on geneettisesti muokattu niin, etteivät ne lyhene. (Freshney 2000)

3.1 WEHI-164

Opinnäytetyössä käytettiin WEHI-164 –solulinjaa, joka on linja hiiren fibroblastisoluista. WEHI-164-linjan solut ovat adherenteja, eli alustaansa kiinnittyviä soluja. (SigmaAldrich, 2016)

Adherentit fibroblastit tarttuvat kasvatusalustaan ja levittyvät näyttäen mikroskoopilla katsottuna pitkänomaisilta säikeiltä. Fibroblastit muodostavat jakautuessaan yhdensuuntaisia järjestelmiä, jotka voi havaita kun solujen konfluenssi on riittävän suuri. Fibroblastit myös tuottavat kollageenia niitä ympäröivään välitilaan, esim. kasvumediumiin. (Freshney 2000)

3.2 3D-solukasvatus

Bioteekniikan ja kudosteknologian alalla on viime vuosina noussut esiin ajatus, että tutkimuksissa tulisi paremmin ottaa huomioon solujen fysiologia sekä niiden kasvuympäristö ja siirtyä niin kutsutusta yksikerros-soluviljelystä kolmiulotteiseen 3D-soluviljelyyn. Vaikka 3D-soluviljelyn perusperiaate vaikuttaa kehityskelpoiselta idealta, liittyy siihen vielä monia ongelmia.

Kaksiulotteisen solukasvatuksen ajatellaan tarkoittavan yleensä solujen yksikerroksista kasvattamista esim. kasvatuspulloissa tai petriمالjalla, eikä tällä tarkoiteta varsinaista absoluuttista 2D-maailmaa. Perinteisemmässä 2D-kasvatuksessa solut ovat kiinnittyneenä kasvatusastian pohjaan, mutta 3D-kasvatuksessa ne voivat kiinnittyä mihin tahansa matriisissa, tai olla kokonaan kiinnittymättä. (Brown 2013)

Eri solutyypit ovat erikoistuneet erilaisiin olosuhteisiin ja ympäristöihin. Vaikka suuri osa nisäkässoluista elää kudoksessa luonnollisessa 3D-ympäristössä, eräät solutyypit, kuten erilaiset epiteelisolut ovat erikoistuneet enemmän 2D-kasvatuksen kaltaisiin olosuhteisiin, jossa niillä on yksi kiinteäpinta johon tarttua ja jatkuva nestefaasi ympäröi niitä muilta pinnoilta. Näitä ovat esimerkiksi solut verisuonten, suoliston ja virtsarakon pinnalla. (Brown 2013)

Solubiologian näkökulmasta solujen 2D-kasvatus on kuitenkin soluille epäluonnollinen tapa kasvaa ja 3D-rakenteen puuttuminen johtaa solut kasvamaan epäsäännöllisessä tasossa, kun ne elimistön sisällä kasvaisivat kolmiulotteisena ja pystyisivät paremmin monimutkaisiin solujen välisiin vuorovaikutussuhteisiin. (Billiet 2012)

4 REOLOGIA JA ELASTINEN MODUULI

Reologia on tieteenala, joka tutkii aineen muodonmuutosta ja virtausominaisuuksia. Reologisilla mittauksilla voidaan määrittää näitä ominaisuuksia sekä nesteille että kiinteille aineille.

Eri aineet voidaan luokitella ominaisuuksiensa perusteella elastisiin, viskoosiin tai viskoelastisiin aineisiin. Aineen elastisuus kuvaa sen kykyä palautua rasituksesta ja viskoosisuus sen kykyä vastustaa virtausta. Viskoelastiset aineet ilmentävät näitä molempia ominaisuuksia.

4.1 Elastiset ominaisuudet oskilaatiomittauksissa

Reologiassa elastisia ominaisuuksia mitataan yleensä oskilaatiomittauksilla ja kuvataan ns. varastomodulilla eli elastisella modulilla (G') joka kuvaa aineen kykyä sitoa mittaauksissa siihen siirrettyä energiaa. Tämän varastoidun energian avulla aine voi palautua rasituksesta alkuperäiseen muotoonsa. Häviömoduuli (G'') taas kuvaa aineen viskoosisia ominaisuuksia aineen rakenteen muuttuessa rasituksessa ja siitä johtuva molekyylien liike synnyttää kitkaa ja lämpöä. Tämä energia ei sitoudu aineeseen, vaan se häviää.

Häviötekijä ($\tan \delta$) kuvaa varastomodulin ja häviömodulin välistä suhdetta. Mikäli tämä suhdeluku on alle yhden, materiaali on nestemäistä. Jos suhdeluku on yli yhden, materiaali on geelimäistä. Tasan arvolla yksi tarkoittaa, että materiaali on geelipisteessä. (Mezger 2011)

4.2 Youngin moduuli

Elastisella modulilla tarkoitetaan useita eri asioita. Yhteistä niillä on, että ne kuvaavat aineen kykyä vastustaa sitä muovaavia voimia ja niitä ilmaistaan jännityksen ja muodonmuutoksen suhteenä. Usein sillä tarkoitetaan Youngin moduulia, eli kimmokerrointa, joka kertoo materiaalin taipuisuudesta, joka on olennainen osa materiaalien ominaisuuksia ja niiden määrittäystä. Youngin moduulia mitataan usein isotermisissä olosuhteissa ja sitä käytetään määrittämään erityisesti lämmöstä johtuvaa rasitusta materiaaleille. Youngin moduuli kuvaa aineen atomien välisiä voimia. Youngin modulun lisäksi on myös muita elastisia moduuleja, kuten Poissonin suhde (Poisson's ratio). (Barron & Barron 2011)

Biomateriaaleina käytettävien materiaalien elastisuudella on suuri merkitys niiden kestävyiden ja toimivuuden kannalta. Biomateriaalien tulee jäljitellä luonnollisen kudoksen elastisia ominaisuuksia, jotta se toimisi elimistössä toivotulla tavalla. Elastinen moduuli vaihtelee eri kudostyypeillä huomattavasti (Taulukko 1) (Bourg & Amaury 2010).

Taulukko 1. Ihmisen eri kudosten elastisia moduuleja.

Kudostyyppi	Youngin moduuli (GPa)
Sydänläppä, aortta	41 - 46
Valtimo	0,03 - 3
Jänne	966
Iho	23 - 44
Hammaskiille	50
Reisiluu	17
Luuohka	0,1

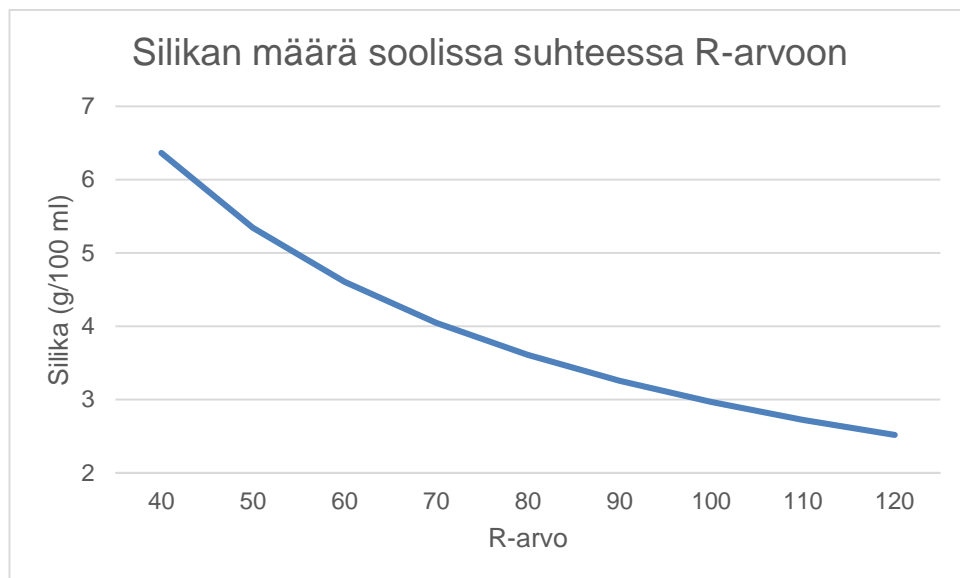
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Kappaleessa käsitellään silikasoolien ja hydrogeelivaahtojen valmistusta, sekä solujen implementointia. Lisäksi kappaleessa kerrotaan vaahtonäytteiden ottamisesta ja käsittelystä reologisia mittauksia varten, sekä viabiliteettimäärytyksiin.

5.1 Silikamatriisin valmistus

Tutkimuksessa käytetyt silikasoolit valmistettiin niin kutsutulla sooli-geeli -menetelmällä.

Silikasoolin valmistuksessa lähtöaineina käytettiin MilliQ-vettä ja 98 % tetraetyyliortosiliikaattia (TEOS) sekä katalyyttinä 1 M suolahappoa (HCl). Tätä hydrolyysi- ja kondensatioreaktiota voidaan kuvata reaktioyhtälöllä $2 \text{H}_2\text{O} + \text{C}_8\text{H}_{20}\text{SiO}_4 \rightarrow 1 \text{SiO}_2 + 4 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, jossa lopputuotteena on piioksidia ja etanolia. Silikasoolin R-arvo ($n_{\text{H}_2\text{O}} / n_{\text{TEOS}}$) kuvaa valmiin soolin suhteellista kuiva-ainepitoisuutta (Kuvio 1). Työssä käytetyt soolit olivat R-arvoiltaan 50 ja 90.



Kuvio 1. Silikan määrä soolissa ja R-arvon määräytyminen.

Sooli valmistettiin 100 ml:n erissä 650 ml:n dekanterilasissa. TEOS lisättiin pumpulla n. 1ml / min HCl-vesi –seokseen. Systeemi pidettiin jatkuvassa sekoituksessa magneet-

tisekoittajan avulla, sauvan pituus oli n. 25 mm, sekoitusnopeus 1000 rpm ja sekoittumista tehostettiin sekoitusesteen avulla. Valmistuksen aikana lämpötilaa reaktioastissa valvottiin digitaalisella lämpömittarilla. Koska kyseessä oli eksoterminen reaktio, lämpötila nousi useita asteita valmistuksen aikana. Liian matala lämpötilan nousu indikoi prosessin epäonnistumisesta, joka saattaa johtaa esim. geeliytymisen hitauteen tai sen epäonnistumiseen.

Reaktiossa muodostuvaa etanolia pyrittiin poistamaan soolista osittaistislauksella, jossa reaktioastiaa kuumennettiin sekoituksessa n. + 60 °C, ilman sekoitusestettä. Samalla sooliin lisättiin 15 ml MilliQ-vettä n. 1 ml / min pumpulla. Kuumennuksen päätyttyä sooli jäähdytettiin jäähauteessa huoneenlämpöön. Lopuksi määritettiin soolin kokonaistilavuus 100 ml mittalasilla ja tarvittaessa täydennettiin se 100 ml tilavuuteen MilliQ-vedellä. Sooli jaettiin kahteen 50 ml:n Falcon-putkeen säilytystä varten. Valmiit soolit säilytettiin kylmiössä n. + 6 °C:ssa.

Solukasvatuskäyttöä varten soolit kuljetettiin ISO 7-luokan puhdistilaan, jossa se suodatettiin laminaarikaapissa 0,2 µm ruiskusuodatimella. Suodatetut soolit säilytettiin puhdistilassa, jääkaapissa n. + 6 °C.

5.2 Vaahtojen valmistus

Silikavaahdot valmistettiin silikasoolin ja medium-emäsluoksen (Liite 4) 2:1 seoksesta (V/V), vaahdottamalla seosta homogenisaattorilla. Vaahdotuksen tarkoituksena on nostaa materiaalin tilavuutta ja siten kasvattaa sen huokoskokoa. Medium-emäsluoksen tarkoituksena on neutraloida soolin pH, sekä laskea pintajännitystä. Medium-emäsluos sisälsi RPMI-1640-mediumia, 1 M NaOH:ia sekä FBS:ia.

Ennen vaahdotusta soolia pipetoitiin dekantterilasiin 4 ml tai 8 ml, riippuen halutusta vaahdontilavuudesta (Taulukko 2). Dekantterilasiin pipetoitiin seuraavaksi medium-emäsluos ja ajanotto käynnistettiin välittömästi sen lisäyksestä. Seosta seisotettiin käytetystä soolista riippuen 1-1,5 minuuttia (Taulukko 4). Seisotuksen päätyttyä aloitettiin vaahdotus. Vaahdotus tehtiin homogenisaattorilla (Ultra Turrax T25) jossa käytettiin 18 mm:n sekoituspäättä. Käytetty nopeus oli 8000 rpm. Vaahdotuksen päätyttyä valmis vahto kaadettiin muoviselle petrimaljalle ja maljaa käännettiin niin, että vahto levittyi tasaisemmin maljan pohjalle (Taulukko 4).

Välittömästi vaahdotuksen päätyttyä pipetoitiin vaahdon päälle solususpensio, jonka jälkeen vaahto siirrettiin inkubaattoriin + 37 °C, 5 % CO₂, odottamaan kasvumediumin lisäystä (Taulukko 2).

Taulukko 2. Sooli-medium -suhde vaahdoissa sekä lisätyt solumäärät

Soolin R-arvo	Soolin tilavuus (ml)	Mediumin tilavuus (ml)	Solujen määrä (milj.)
R50	4	2	1
	8	4	2
R90	4	2	1
	8	4	2

5.3 Solujen lisääminen biomateriaalille

Ennen solujen lisäämistä matriisivaahdolle, solujen lukumäärä määritettiin laskemalla ne hemosytometrissä. Laskemisen jälkeen solut suspensoitiin RPMI-kasvatusmediumiin niin, että suspensio sisälsi soluja n. 0,5 milj./1 ml.

Solususpensio pipetoitiin matriisivaahdolle mahdollisimman pian vaahdotuksen päättymisestä, korkeintaan minuutin kuluessa. Aiemmin projektiin tehdyissä soluvaahdotuksiin, solut on suspensoitu pienempään määrään kasvumediumia ja näin vaahdoille lisätyn suspension määrä on ollut tilavuudeltaan pienempi. Nyt solut suspensoitiin aiempaa suurempaan RPMI-kasvumedium määrään, jotta ne jakautuisivat tasaisemmin materiaaliin. Solujen lisäyksen jälkeen materiaalin annettiin asettua inkubaattorissa (37 °C, 5 % CO₂) n.10 min ennen kasvatusmediumin lisäystä.

Vaahtoja tehtiin kahta eri tilavuutta ja kahta eri R-arvoa. Eri materiaalitilavuuksille lisättiin soluja samassa suhteessa (Taulukko 2).

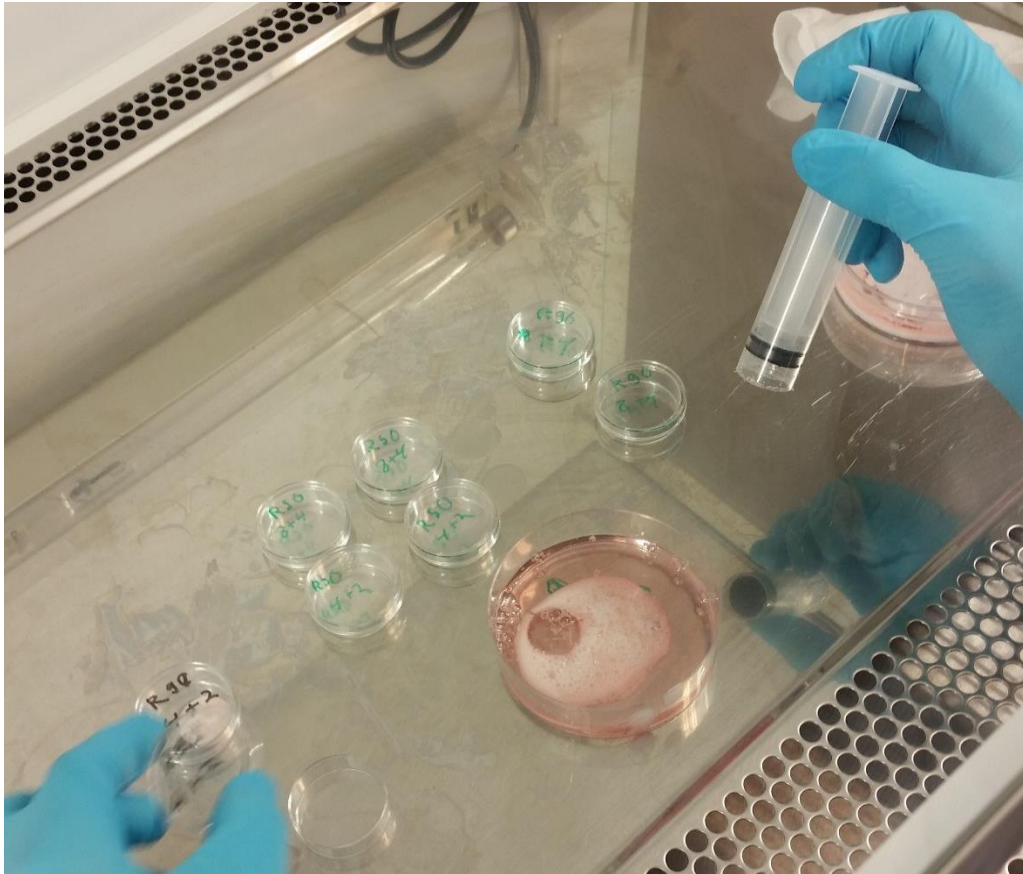
5.4 Vaahtonäytteet ja niiden tutkiminen

Vaahtomateriaalin muutoksia mitattiin reologisilla mittauksilla. Puhdastilassa, inkubaattorissa säilytetyissä vaahdoista otettiin laminaarikaapissa näytteitä katkaistulla 15 ml ruiskulla, niin että vaahtonäyte säilyi mahdollisimman ehjänä n. 1,5 cm halkaisijaltaan olevana kappaleena, joka ulottui vaahdon pinnalta pohjaan saakka (Kuva 1). Näytteet siirrettiin pienissä muovisissa, kannellisissa petrimaljoissa puhdastilasta reometrihuoneeseen, jossa niitä säilytettiin inkubaattorissa (+ 37 °C) eri näytteiden mittausten välillä.

Viabiliteettimittauksia varten vaahdoilta otettiin näytteet katkaistulla 1 ml pipetinkärjellä. Näytteet otettiin 24-kuoppalevyille alamarBlue®-testausta varten. Näytteet olivat halkaisijaltaan n. 0,5 cm ja myös ne ulottuivat koko hydrogeelivaahdon läpi.

Vaahtonäytteitä otettaessa voitiin havaita eri R-arvoisten soolien käytön vaikutus hydrogeelivaahdon rakenteeseen ja mekaanisen käsittelyn kestävyys. R50-sooleista valmistettujen vaahtojen näytteitä oli helpompi käsitellä näytteenottovaiheessa ja ne säilyivät eheämpinä kuin R90-sooleista valmistettujen hydrogeelivaahtojen näytteet. R90-pohjaisten hydrogeelivaahtojen näytteet olivat rakenteeltaan hauraampia ja ne niiden rakenne hajosi herkästi näytettä otettaessa.

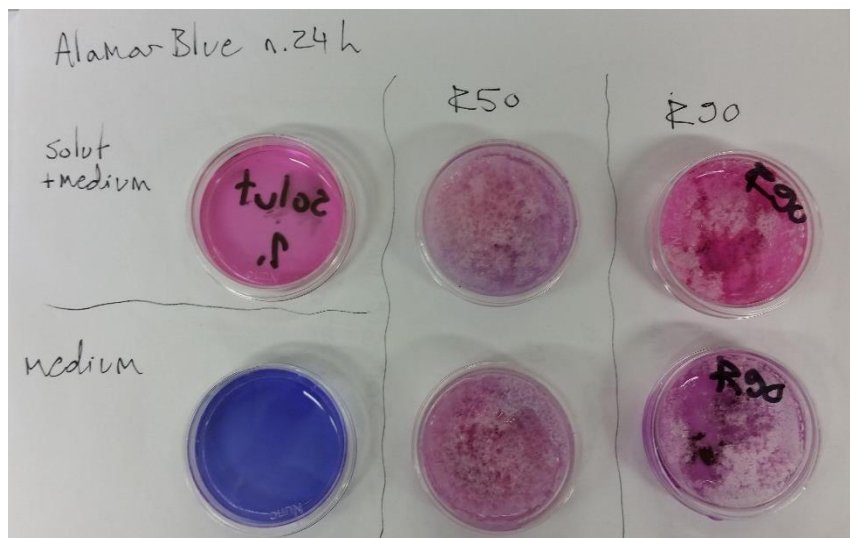
Hydrogeelivaahtoja tarkasteltiin muutamaa otteeseen myös puhdastilassa sijaitsevalla mikroskoopilla. Tarkastelussa tutkittiin mm. matriisimateriaalista vapaina olevien solujen määrää, sekä pyrittiin havaitsemaan materiaaliin kapseloituneita soluja.



Kuva 1. Vaahtonäytteiden ottaminen laminaarikaapissa

5.5 Solujen viabiliteetti

Solujen viabiliteetin määrittämisessä käytettiin alamarBlue®-reagenssia. AlamarBluen® toiminta perustuu sen ei-fluoresoivan molekyylin, resazurinin muutokseen fluoresoivaksi resorufiniksi, kun se reagoi solujen aineenvaihduntatuotteisiin liuoksessa. Tutkittavasta näytteestä mitataan fluoresenssi spektrofotometrillä tai kuoppalevylukijalla käyttäen aallonpituuksia 560 EX nm/590 EM nm. (ThermoFisher 2016) Mikäli solujen aktiivisuus on suurta, voi värinmuutoksen havaita myös paljaalla silmällä (Kuva 2). Suuri aktiivisuus saa reagenssin vaihtamaan värin kirkkaan vaaleanpunaiseksi, kun taas solujen vähäinen aktiivisuus jättää reagenssin hyvin sini-sävyiseksi.



Kuva 2. AlamarBlue® silikavaahdoissa ja solususpensiassa

Solujen viabiliteettimittauksia varten silikavaahdoista otettiin näytteitä katkaistulla 1 ml:n pipetinkärjellä. Näytteet siirrettiin 24-kuoppalevylle ja vaahtonäytteen päälle pipetoitiin 1000 µl kasvatusmediumia sekä 100 µl alamarBlue®-reagenssia. Tämän jälkeen kuoppalevy siirrettiin inkubaattoriin (+ 37 °C, 5 % CO₂). Kuoppalevyä inkuboitii noin vuorokausi ennen näytteiden ottamista kasvatusmediumista 96-kuoppalevylle. 96-kuoppalevylle pipetoitujen näytteiden tilavuus oli 100 µl. Pipetoimalla näyte 24-kuoppalevyltä 96-kuoppalevylle, päästiin eroon 24-kuoppalevyllä olevista vaahtonäytekkappaleista, jotka muuten olisivat voineet häiritä fluoresenssimittauksia kuoppalevylukijalla. Lisäksi 24-kuoppalevylle tehtiin nollanäyte kasvatusmediumista ja alamarBluesta, samassa suhteessa kuin muut näytteet. Näytteistä mitattiin fluoresenssi Hidex Sense-laitteella. Mittauksissa käytetyt aallonpituudet olivat eksitaatiolle (EX) 544 nm ja emissiolle (EM) 595 nm.

5.6 Reologiset mittaukset

Opinnäytetyössä tutkittiin hydrogeelivaahtojen reologisia muutoksia vajaan kuukauden ajanjaksolla, alkaen vaahtojen valmistuspäivästä. Mittauksia suoritettiin materiaalin ollessa 1- 21 päivää vanhaa. Materiaalien määrät olivat rajalliset, jonka takia kaikista vaahto-tilavuuksista ei ole mittaustuloksia jokaiselta mittauspisteeltä ja seurantajakso on lyhyempi kuin viabiliteetin seurannassa. Eri R-arvoista sooleista tehdyistä vaahdoista

on kuitenkin mittaustulokset jokaiselta mittauspäivältä (Taulukko 3). Tutkittavat hydrogeelivaahdot säilytettiin koko seurantajakson ajan inkubaattorissa (+ 37 °C, 5 % CO₂) puhtastilassa kasvumediumilla peitettynä.

Taulukko 3. Hydrogeelivaahdoilta tehdyt reologiset mittaukset.

Käytetty sooli ja kokonaistilavuus	Vaahtojen ikä (vrk)						
	1	2	3	6	7	21	
R50 2+4	X	X					Mittaus tehty
R50 4+8			X	X	X	X	
R90 2+4	X		X	X			
R90 4+8	X	X			X	X	

Mittauksissa käytettiin ns. levy-levy-mittapäätä, jossa kiinteän pohjalevyn päälle asetetaan pyöreä, halkaisijaltaan n. 20 mm, tasainen mittapää, joka mittauksessa liikkuu tasaisesti 1 mm etäisyydellä pohjalevystä. Mittalevyjen välille asetetaan näyte. Levy-levy-mittapäällä mitattaessa leikkausvoima ei ole vakio koko näytteen alalta, vaan se kasvaa reunoja kohden. Levy-levy-mittapää on tarkoitettu erityisesti geelien mittaamiseen. (Mezger 2011)

6 TULOKSET

Tässä kappaleessa on esitetty opinnäytetyön käytäntövaiheen aikana saadut tärkeimmät tulokset. Ensimmäiseksi on esitetty fluoresenssimittauksista tehdyt viabiliteettimäärittysten tulokset. Jälkimmäisessä kappaleessa esitetään reologisten mittausten tärkeimmät tulokset.

6.1 Solujen viabiliteetti

Hydrogeelivaahoja tehtiin yhteensä kahdeksan kappaletta, käyttäen kahta eri soolia. Kummastakin soolista valmistettiin hydrogeelivaahdot kahdella eri tilavuudella sekä rinnakkaiset vaahdot molemmille tilavuuksille (Taulukko 4).

Taulukko 4. Hydrogeelivaahdot.

Materiaali	Koostumus			Valmistusaika		Lopullinen R-arvo	Soluja	Seuranta
	Sooli		medium-emäs -liuos	Odotus	Vaahdotus			
	R-arvo	ml	ml	min	min		milj.	vrk
Vaahto 1	50	4	2	1	4	81	1	30
Vaahto 2	50	4	2	1	4	81	1	30
Vaahto 3	50	8	4	1	4	81	2	30
Vaahto 4	50	8	4	1	4	81	2	30
Vaahto 5	90	4	2	1	4,5	141	1	30
Vaahto 6	90	4	2	1	4,5	141	1	30
Vaahto 7	90	8	4	1	4,5	141	2	30
Vaahto 8	90	8	4	1	4,5	141	2	30

Solujen viabiliteettia vaahdoissa tutkittiin 30 vuorokauden ajan. Viabiliteetin määrittämiseksi hydrogeelivaahdoilta otettiin näyte 24-kuoppalevyille katkaistulla 1 ml pipetinkärjellä. Näytteen päälle, kuoppalevyille lisättiin 100 µl alamarBlue®-reagenssia sekä 1000 µl RPMI-kasvatusmediumia. Kuoppalevyä inkuboitin (+ 37 °C, 5 % CO₂) noin vuorokausi. Inkuboinnin jälkeen, 24-kuoppalevyiltä otettiin 100 µl näytteet 96-kuoppalevyille ja mitattiin fluoresenssi kuoppalevylukijalla.

Hydrogeelivaahdot 1 ja 2

Hydrogeelivaahdot 1 ja 2 olivat toistensa rinnakkaiset vaahdot ja ne tehtiin samoin parametrein, mutta silmämääräisesti arvioituna Vaahdot 1 ja 2 olivat kiinteämpiä kuin Vaahdot 2. Molemmille vaahdoille oli pipetoitu saman verran solususpensiota. Seurannan aikana vaahdoilta otettiin yhteensä kolme viabiliteettinäytettä (Taulukko 5). Hydrogeelivaahdot 1 ja 2 tuottivat seurannan aikana muita hydrogeelivaahdotta paremmat tulokset viabiliteettimäärityksissä. Erityisen korkeasta viabiliteetistä indikoiva fluoresenssi oli Vaahdot 1:lle korkea seurantajakson ajan.

Taulukko 5. Fluoresenssimittaukset, hydrogeelivaahdot 1 ja 2.

	Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali-tausta - suhde
Vaahdot 1	13	229787	9,15
	20	279890	14,09
	30	248040	13,36
Vaahdot 2	13	1835	1,07
	20	50656	3,37
	30	56986	3,84

Hydrogeelivaahdot 3 ja 4

Hydrogeelivaahdot 3 ja 4 olivat keskenään rinnakkaiset vaahdot ja niiden tilavuus oli kaksinkertainen verrattuna kahteen ensimmäiseen vaahdoton (Taulukko 6). Molemmat olivat ulkoisesti samankaltaisia ja silmämääräisesti tarkasteluna niiden huokostilavuus oli samaa luokkaa. Rakenne pysyi silmämääräisesti arvioituna samankaltaisena koko

seurannan ajan. Viabiliteettimäärittämisessä hydrogeelivaahtojen 3 ja 4 näytteet eivät antaneet taustasignaalin ylittävää signaalia fluoresenssimittauksissa.

Taulukko 6. Fluoresenssimittaukset, hydrogeelivaahto 3 ja 4.

	Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali-tausta - suhde
Vaahto 3	13	-541	0,98
	20	-1863	0,91
	30	-1015	0,95
Vaahto 4	13	-658	0,98
	20	-746	0,97
	30	-340	0,98

Hydrogeelivaahdot 5 ja 6

Hydrogeelivaahdot 5 ja 6 olivat pienemmän tilavuuden vaahdot, jotka tehtiin R90-soo-
lista, eli niiden kuiva-ainepitoisuus oli vaahtoja 1-4 pienempi. Viabiliteettimittauksissa
vaahdoissa 5 ja 6 ei havaittu taustan signaalin ylittävää fluoresenssisignaalia (Taulukko
7). Pienemmästä kuiva-aine pitoisuudesta johtuen valmis hydrogeelivaahdot kyllä sen
pääle lisätyn kasvumediumin päällä koko seurantaajan ajan. Tämä on voinut vaikuttaa
vaahdon kapseloituneiden solujen selviytymiseen vaahdon sisällä.

Taulukko 7. Fluoresenssimittaukset, hydrogeelivaahdot 5 ja 6.

	Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali-tausta - suhde
Vaahto 5	13	- 2398	0,915
	20	-1338	0,94
	30	-1373	0,93
Vaahto 6	13	-2108	0,93
	20	-959	0,96
	30	-1525	0,92

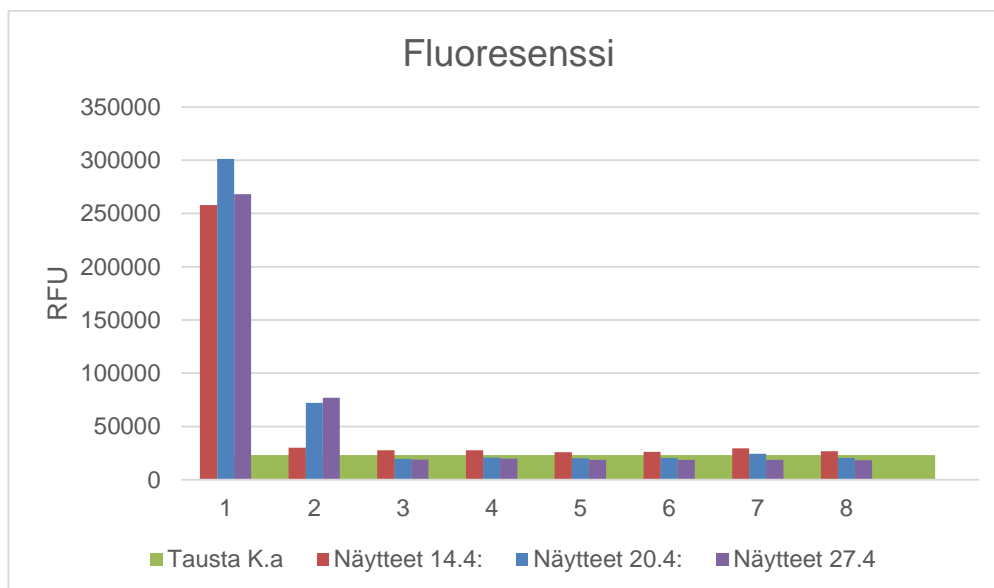
Hydrogeelivaahdot 7 ja 8

Hydrogeelivaahdot 7 ja 8 tehtiin R90-soolista ja niiden tilavuus oli kaksinkertainen toisiin R90-pohjaisiin vaahtoihin verrattuna. Isommasta tilavuudesta johtuen vaahto peitti koko petrimaljan, tarttuen myös reunoille. Tästä huolimatta vaahto pyrki kellumaan kasvumediumin päällä. Viabiliteettimittaukset vaahtoista 7 ja 8 eivät antaneet solujen selviytymisestä indikoivaa fluoresenssisignaalia yhdessäkään näytteessä (Taulukko 8).

Taulukko 8. Fluoresenssimittaukset, hydrogeelivaahdot 7 ja 8.

	Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali-tausta - suhde
Vaahto 7	13	1404	1,05
	20	2844	1,13
	30	-1429	0,93
Vaahto 8	13	-1390	0,95
	20	-990	0,95
	30	-1646	0,92

Hydrogeelivaahdoista otettujen näytteiden fluoresenssimittaustulokset pysyivät samoissa suuruusluokissa koko seurantajakson ajan (Kuvio 2). Niiden perusteella voidaan päätellä solujen säilyneen elossa vaahdoissa 1 ja 2, jotka olivat molemmat R50-pohjaisia, pienemmän tilavuuden vaahtoja.



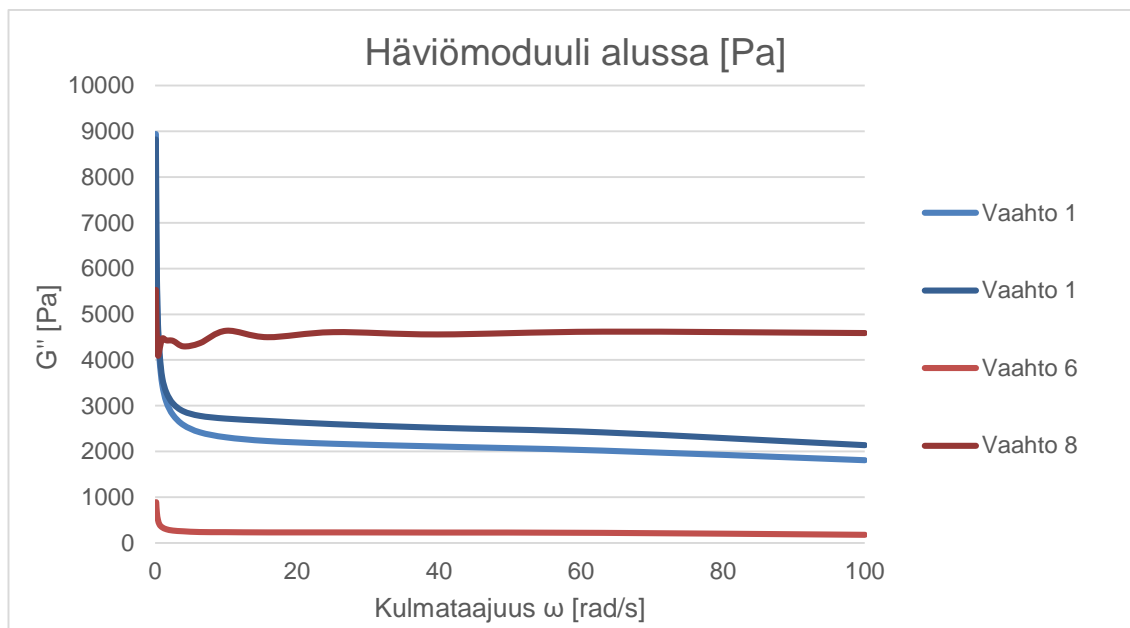
Kuvio 2. Viabiliteettinäytteiden fluoresenssi seurantajaksolla

6.2 Reologiset mittaukset

Opinnäytetyössä tehdyistä hydrogeelivaahdoista tehtiin reologisia mittauksia solukasvatuksen aikana. Mittauksissa tutkittiin R-arvon vaikutusta materiaaliin ja sen käyttäytymiseen, sekä seurattiin muutoksia materiaalissa. Vaahdoista otettiin näytteitä 21 päivän ajanjaksolla. Näytteidenottoa rajoitti materiaalin riittävyys. Näytteistä mitattiin häviö- ja varastomoduulit, joiden perusteella voitiin laskea materiaalin häviötekijä.

Hydrogeelivaahtojen häviömoduuli

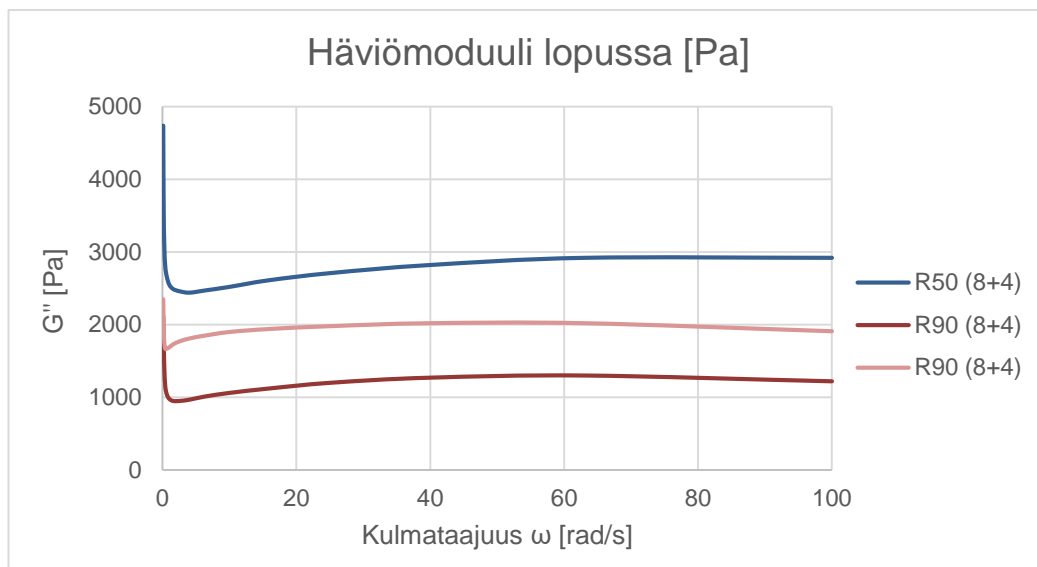
R90-soolista valmistetulla, pienemmän tilavuuden hydrogeelivaahdolla, on selvästi muita vaahtoja pienempi häviömoduuli ensimmäisen vuorokauden aikana tehdyssä mittauksessa (Kuvio 3). R50-soolista valmistetut vaahtot ovat toistensa rinnakkaiset, eli ne on otettu samasta hydrogeelivaahdosta. Näiden vaahtojen häviömoduulit ovat lähes identtiset (Kuvio 3).



Kuvio 3. Hydrogeelivaahtojen häviömoduuli seurantajakson alussa.

Materiaalien rajallisesta määrästä johtuen reologisia mittauksia ei voitu tehdä täysin samoista hydrogeelivaahdoista jokaisessa mittauspisteessä. Jokaisessa mittauksessa mitattiin kuitenkin eri R-arvoisesta sooleista valmistettuja vaahtoja ja vain vaahtonäytteiden alkuperäinen tilavuus vaihteli. Seurantajakson lopussa tehdyssä mittauksessa voidaan todeta R50-soolista valmistetun vaahdon häviömoduulin olevan hieman korkeampi kuin seurantajakson alussa tehdyn mittauksessa (Kuvio 4), tosin on huomioitava, että vaahtojen alkuperäinen tilavuus on eri.

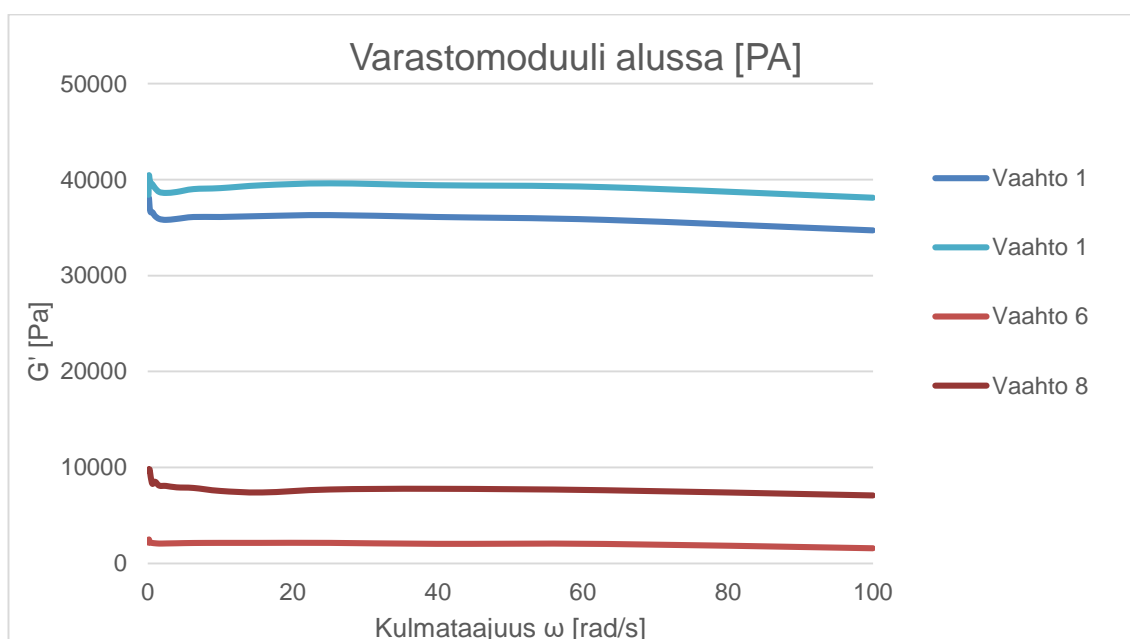
R90-sooleista valmistettujen hydrogeelivaahtojen häviömoduulit poikkeavat toisistaan paljon jo seurantajakson alussa (Kuvio 3), mitä tosin selittää osittain vaahtojen tilavuusero. Seurantajakson lopussa suuremman tilavuuden R90-soolista valmistettujen hydrogeelivaahtojen häviömoduuli (Kuvio 4) on pudonnut lähes puoleen seurantajakson alussa mitatusta.



Kuvio 4. Hydrogeelivaahtojen häviömoduuli seurantajakson lopussa.

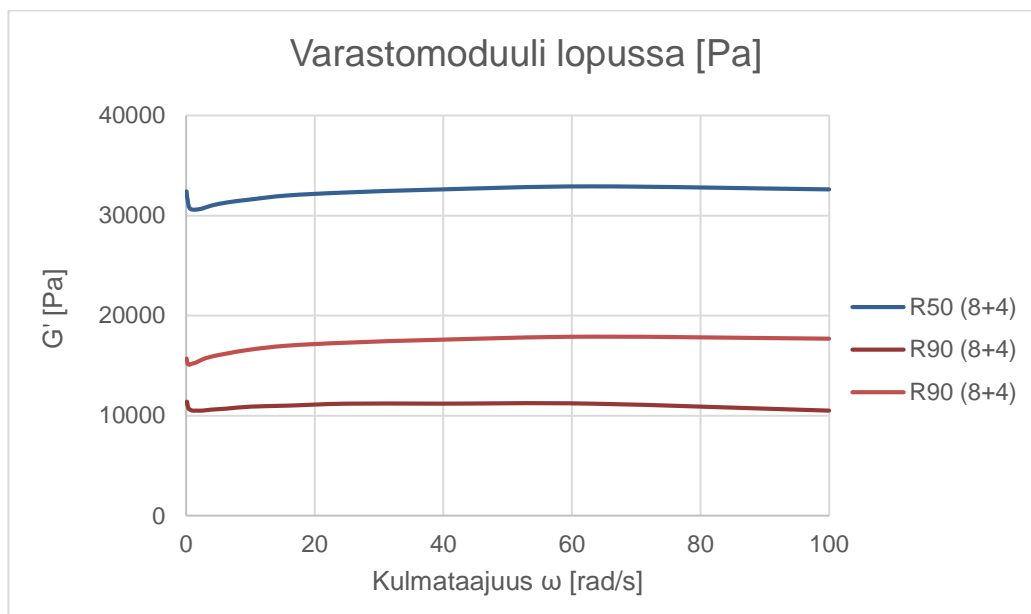
Hydrogeelivaahtojen varastomoduuli

Hydrogeelivaahdoista mitattu varastomoduuli (Kuvio 5) eli elastinen moduuli, on R50-soolista valmistetuille vaahdoille hyvin samanlainen, kuten tuleekin olla, sillä näytteet ovat rinnakkaiset. Myös R90-soolista valmistettujen vaahtojen varastomoduulit ovat keskenään melko samanlaiset. Kuitenkin R90-soolista valmistettujen vaahtojen alkuperäinen tilavuus oli toisessa näytteessä kaksinkertainen.



Kuvio 5. Hydrogeelivaahtojen varastomoduuli seurantajakson alussa.

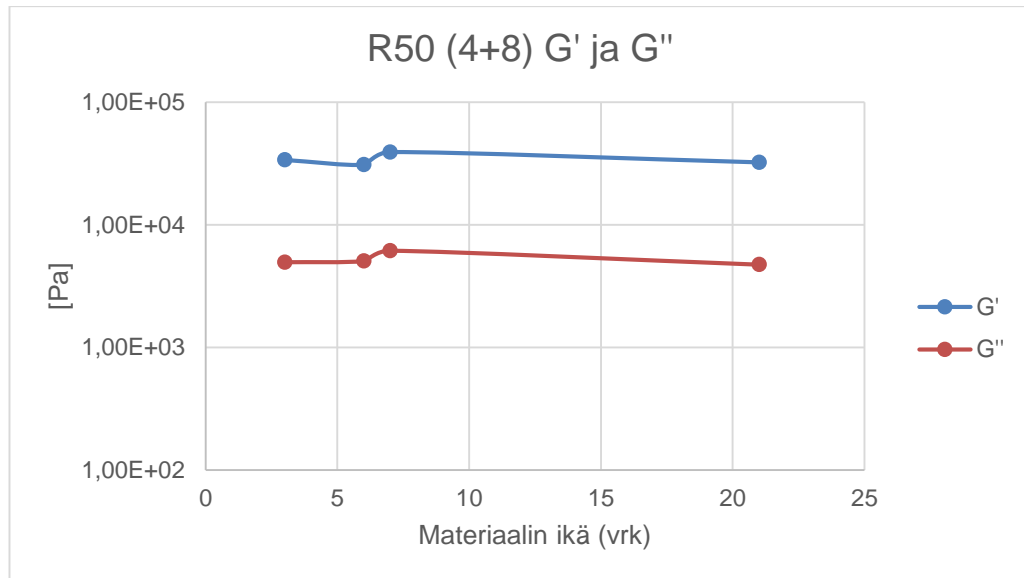
Seurantajakson lopussa tehdyistä mittauksista (Kuvio 6) voidaan todeta, ettei varastomoduuleissa ole tapahtunut suurta muutosta. R50-soolista valmistetun vaahdon varastomoduuli on vain hieman pienempi, kuin pienemmän tilavuuden R50-pohjaisen vaahdon varastomoduuli on ollut seurantajakson alussa. Suuremman tilavuuden R90-soolista valmistettujen hydrogeelivaahtojen varastomoduulissa voidaan havaita hydrogeelivaahtojen varastomoduulissa kasvua toisen näytteen kohdalla. Toisen R90-soolista valmistetun näytteen varastomoduuli oli suuruusluokaltaan sama kuin seurantajakson alussa.



Kuvio 6. Hydrogeelivaahtojen varastomoduuli seurantajakson lopussa.

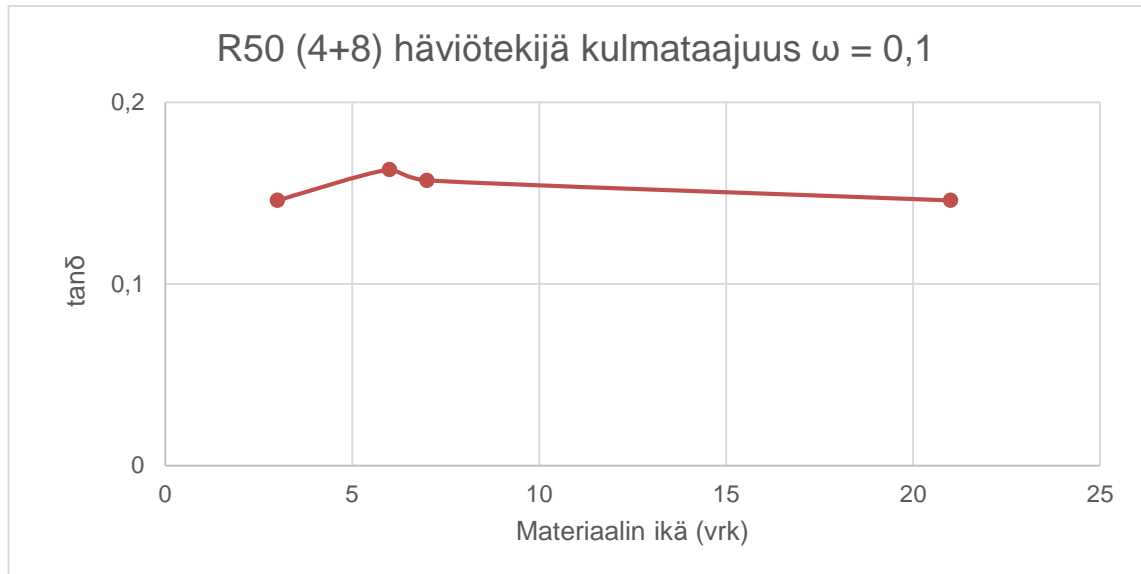
R50-soolipohjainen hydrogeelivaahto

R50-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon varasto- ja häviömoduulia vertailtaessa, (Kuvio 7) voidaan todeta niiden muutoksien olevan hyvin samankaltaiset seurantajakson aikana.



Kuvio 7. R50-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon varasto- ja häviömoduuli seurantajakson aikana.

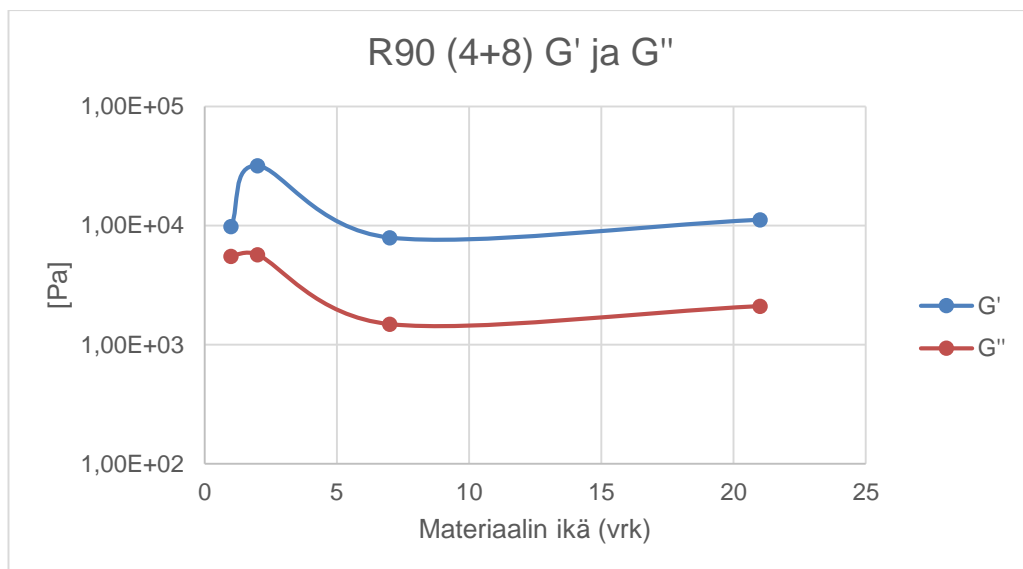
Häviötekijä laskettiin mitattujen varasto- ja häviömoduulien perusteella. Esitettyjen häviötekijöiden kulmataajuus on kaikissa pisteissä 0,1. R50-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon häviötekijä (Kuvio 8) pysyi tasaisena koko seurantajakson ajan. Häviötekijä pysyttelee vahvasti alle arvon 1, joka tarkoittaa materiaalin olevan geelimäistä, nestemäisen sijaan.



Kuvio 8. R50-soolista valmistetun vaahdon häviötekijä seurantajaksolla.

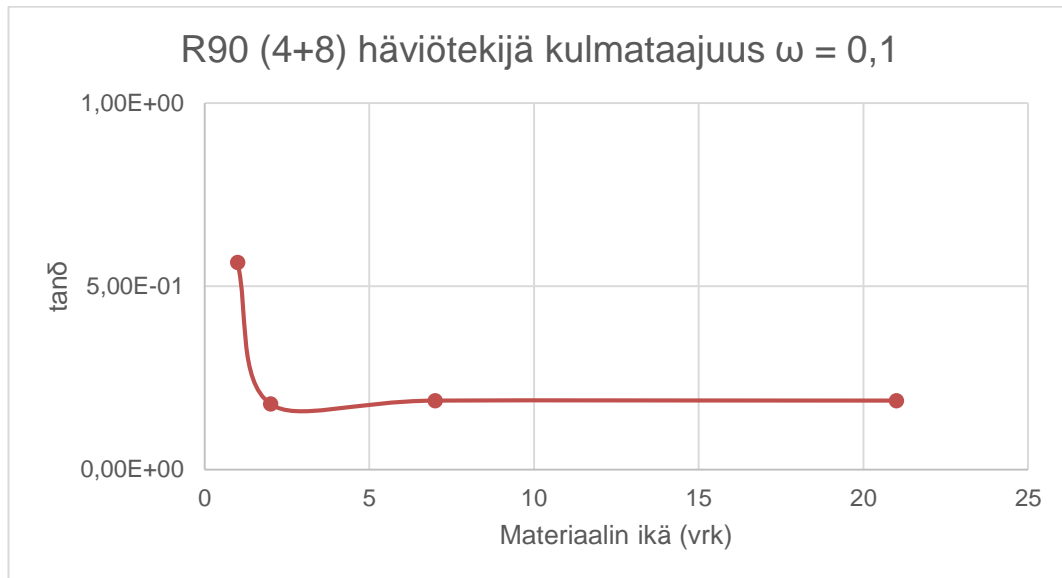
R90-soolipohjainen hydrogeelivaahdo

Isomman tilavuuden R90-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon häviö- ja varastomoduuleissa (Kuvio 9) on seurantajakson alussa jonkin verran eroa, mutta erot tasaantuvat seurantajakson loppua kohden, jolloin moduulit ovat kehittyneet lähes identtisesti.



Kuvio 9. R90-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon varasto- ja häviömoduuli seurantajakson aikana.

R90-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon häviötekijä (Kuvio 10) on seurantajakson alussa ollut huomattavasti korkeampi kuin se oli jakson lopussa. Mittauksissa häviötekijän arvo ei kuitenkaan kertaakaan ollut yli arvon 1, eli materiaali on ollut geelimäistä koko mittausjakson ajan.



Kuvio 10. R90-soolista valmistetun vaahdon häviötekijä seuranta jaksolla.

7 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli kapseloida nisäkässoluja (WEHI-164) hydrogeelivaahtoon, sekä pitää yllä niiden viabiliteettia ja kasvua kuukauden ajan. Työn toisena tavoitteena oli saada lisää toistettavuutta aiemmista tutkimustöistä saaduille tuloksille R50-pohjaisten hydrogeelivaahtojen käytöstä. Lisäksi tutkittiin R90-pohjaisten hydrogeelivaahtojen käyttöä solukapseloinnissa. Lisäksi työssä tutkittiin vaahtojen tilavuuden nostamista ja sen vaikutuksia solujen viabiliteettiin sekä materiaalin muutoksiin.

Solujen kapselointi ja niiden viabiliteetin ylläpito onnistui vain R50-soolista valmistetulla vaahdolla. Solujen hengissäsäilymiseen on todennäköisesti vaikuttanut korkeamman kuiva-ainepitoisuuden lisäksi muiden kuin R50-soolista valmistettujen hydrogeelivaahtojen kelluminen kasvatusmediumissa. Kelluvaan vaahtoon kapseloituneet solut eivät ole pystyneet normaaliin aineenvaihtoon ilman ympäröivää nestefaasia ja ovat siksi kuolleet ennen ensimmäistä viabiliteettitestiä. Kuiva-ainepitoisuuden lisäksi kellumiseen on todennäköisesti vaikuttanut hydrogeelivaahtojen huokoskoko ja mahdollisesti matalampi bulkkitilavuus. Korkeimman viabiliteetin antaneella hydrogeelivaahdolla oli visuaalisesti tarkasteltuna muita pienempi huokostilavuus ja sen rakenne näytti muita vaahtoja tiiviimmältä. Pienempi huokostilavuus on voinut vaikuttaa myös solujen aineenvaihduntaan ja kapseloitumiseen yleisesti.

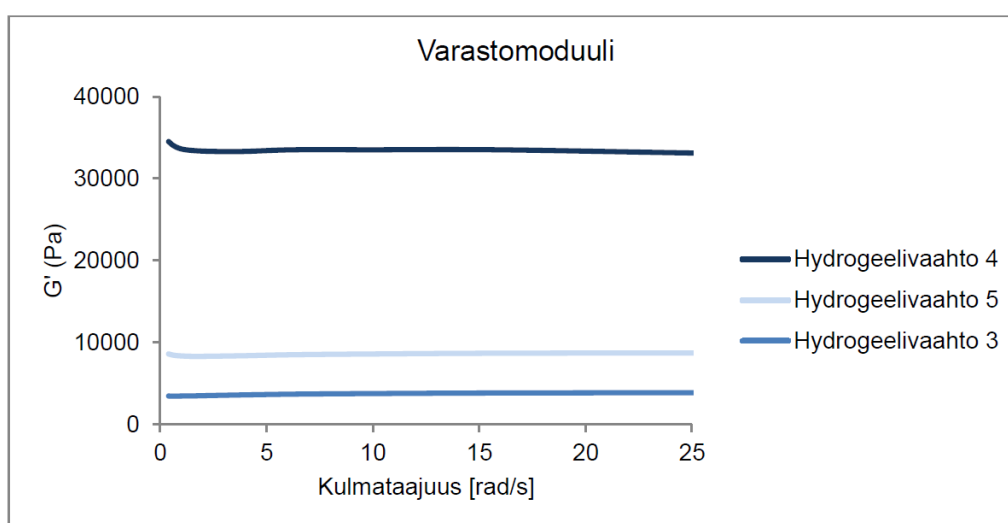
Reologisten mittausten perusteella voidaan todeta, että R50-sooleista valmistettujen hydrogeelivaahtojen varastomoduuli pysyi lähes samana koko seurantajakson ajan, kun taas häviömoduuli nousi hieman. Tästä voi päätellä R50-sooliin pohjautuvien vaahtojen kyvyn palautua muotoonsa rasituksen alla heikentyy ajan kuluessa. Vastaavasti R90-soolista valmistettujen hydrogeelivaahtojen varastomoduuli nousi seurannan aikana, kun sen häviömoduuli laski. R90-pohjaisten vaahtojen kyky palautua rasituksen alla alkupe räiseen muotoonsa parani.

Myös opinnäytetyötä edeltäneessä tutkimuksessa oli tutkittu hydrogeelivaahtojen reologiaa. Tässä työssä vaahdot olivat vähintään 30 vuorokautta vanhoja. Aiemmassa työssä tutkittujen hydrogeelivaahtojen tilavuudet ja käytettyjen soolien R-arvot (Taulukko 9) eivät olleet täysin samat kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa. Voidaan kuitenkin todeta, että nyt ja aiemmin saatujen reologisten mittaustulosten välillä oli jonkin verran vaihtelua.

Taulukko 9. Aiemmin projektissa tutkitut hydrogeelivaahdot.

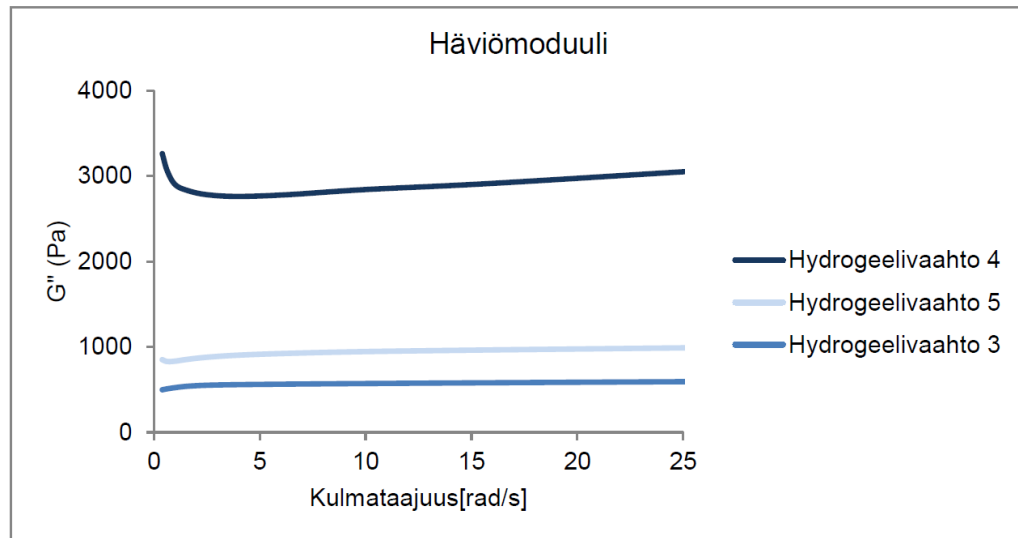
R-arvo	Tilavuus (ml)		Materiaalin ikä
	Sooli	Medium-emäsluos	
50	4	1,8	30 vrk
50	20	10	33 vrk
70	8	4	30 vrk

Aiemmissa mittauksissa kahden eri R50-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon varastomoduulit poikkeavat toisistaan huomattavasti. Tässä työssä saatuihin varastomoduuli seurantajakson lopussa –tuloksiin verrattuna, R50-soolista valmistetun hydrogeelivaahdon moduuli vastaisi pitkälti Hydrogeelivaahdo 4 –näytteen (Kuvio 11) varastomoduulia. On kuitenkin huomioitava, että tässä näytteet ovat 30 vuorokauden ikäisiä, poikkeuksena Hydrogeelivaahdo 4, joka on 33 vuorokauden ikäinen.



Kuvio 11. Hydrogeelivaahdojen varastomoduuli aiemmassa tutkimuksessa. (Lehtilä 2015)

Edellisen tutkimuksen hydrogeelivaahdoista mitatuista häviömoduuleista (Kuvio 12) ei juuri löydy korrelaatiota yhdenkään tässä työssä tutkitun hydrogeelivaahdon kanssa. Mitaukset tehty samassa aikapisteessä kuin yllä.



Kuvio 12. Hydrogeelivaaktojen häviömoduuli aiemmassa tutkimuksessa. (Lehtilä 2015)

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Solut pysyivät hengissä 30 vuorokautta R50-sooliin valmistetuissa vaahdoissa, tutkista tilavuuksista pienemmässä. Mikroskoopilla tutkittaessa voitiin nähdä solujen materiaaliin kapseloitumisen onnistuneen.

R90-pohjaisten hydrogeelivaahtojen kuiva-ainepitoisuus oli ilmeisesti niin pieni, että se aiheutti materiaalin kellumista, kun sen päälle lisättiin RPMI-kasvumedium. Tämä on mahdollisesti ollut osasyynä miksi solut eivät selvinneet hengissä seurantajaksolla. Voidaan kuitenkin olettaa, että solut ovat lisäysvaiheessa kapseloituneet vaahdon sisään, eikä soluja ole jäänyt ikään kuin vapaaksi maljan pohjalle antamaan virheellistä signaalia viabiliteetistä.

Käytetyistä materiaaleista vain R50-soolista valmistetut vaahdot pystyivät tukemaan solujen kasvua ja viabiliteettia pidemmällä ajanjaksolla. R90-soolista valmistetut vaahdot eivät mittausten valossa sovellu solujen kasvatusmatriisiksi.

Hydrogeelivaahtojen rakenteissa ei tapahtunut silmin havaittavaa muutosta seurantajakson aikana, jos ei oteta huomioon näytteenotosta aiheutuvaa räsytystä vaahdoille. Näytteenoton aikana vaahdosta herkästi irtoaa pieniä kappaleita kasvumediumin joukkoon, jolloin vaahto voi näyttää murentuneen.

LÄHTEET

- Barron, R. F., Barron B. R. 2011. *Design for Thermal Stresses (1)*. Wiley.
- Billiet T. 2012. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering.
- Bourg, H., Amaury L. 2010. *Biomaterials Developments and Applications*. Nova Science Publishers, Inc.
- Brown, R. A. 2013. *Extreme Tissue Engineering : Concepts and Strategies for Tissue Fabrication*. Wiley-Blackwell.
- Freshney R. I. 2000. *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique*. Wiley-Liss Inc.
- Hinderera S., Lee Layland S., Schenke-Layland K. 2016. ECM and ECM-like materials — Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy . 97.
- Lehtilä H., 2015 Solujen viabiliteetin määrittäminen geelimäisissä ja vaahtomaisissa biomateriaaleissa. Opinnäytetyö Turku AMK
- Jokinen, M., Jalonen, H., Forsback, A., Koskinen, M. 2010. Method for preparing silica compositions, silica compositions and uses thereof. Patenttinumero: US 2010/0119500 A1
- Mezger T. 2011. *The Rheology Handbook, 3rd Revised Edition*.
- Rimmer S. 2011. *Biomedical Hydrogels*.
- Salerno A., Pascual C. D. 2014. Bio-based polymers, supercritical fluids and tissue engineering.
- Scientific, T. *ThermoFisher Scientific*. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alarblue-rapid-and-accurate-cell-health-indicator.html#what> Viitattu 12.4.2016
- SigmaAldrich. 2016 *WEHI 164 Cell line from mouse*. (Sigma-Aldrich), from Sigma-Aldrich Retrieved from :

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/87022501?lang=fi®ion=FI>
Viitattu 11.4.2016

Stocum D. L. 2010. Regenerative Biology and Medicine.

Tiwari, Ashutosh, Ramalingam, Murugan, Kobayashi, Hisashi 2012. Biomedical Materials and Diagnostic Devices. Wiley-Scrivener.

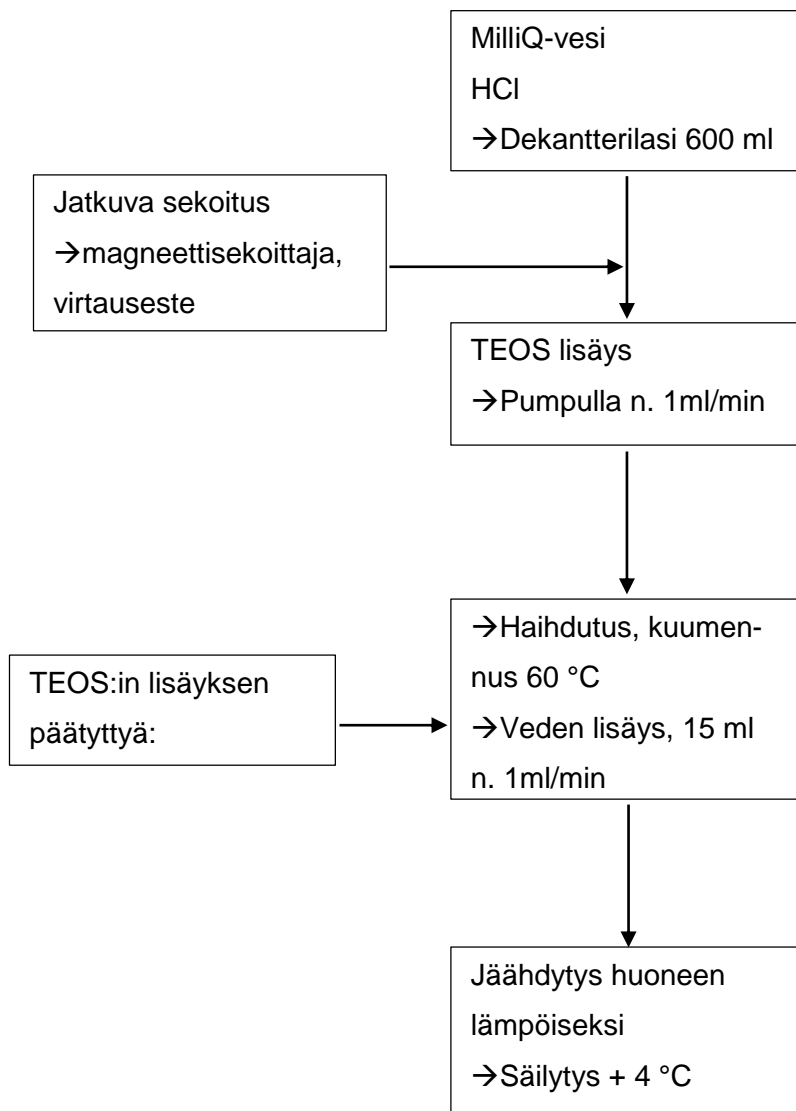
Törmälä, P. Aho A., Anderson, Ö., Heikkilä, J., Keränen, J., Konttinen, Y., Lappalainen, R., Lepojärvi, M., Nevalainen, J., Santavirta, S., Salenius, J., Tarvainen, T., Törmälä, P., Vallittu, P., Viljanen, V., Waris & E., Waris, V. 2003. Yleiskatsaus terveydenhuollon laitteissa ja tarvikkeissa käytettyihin biomateriaaleihin.

Työssä käytetyt soolit

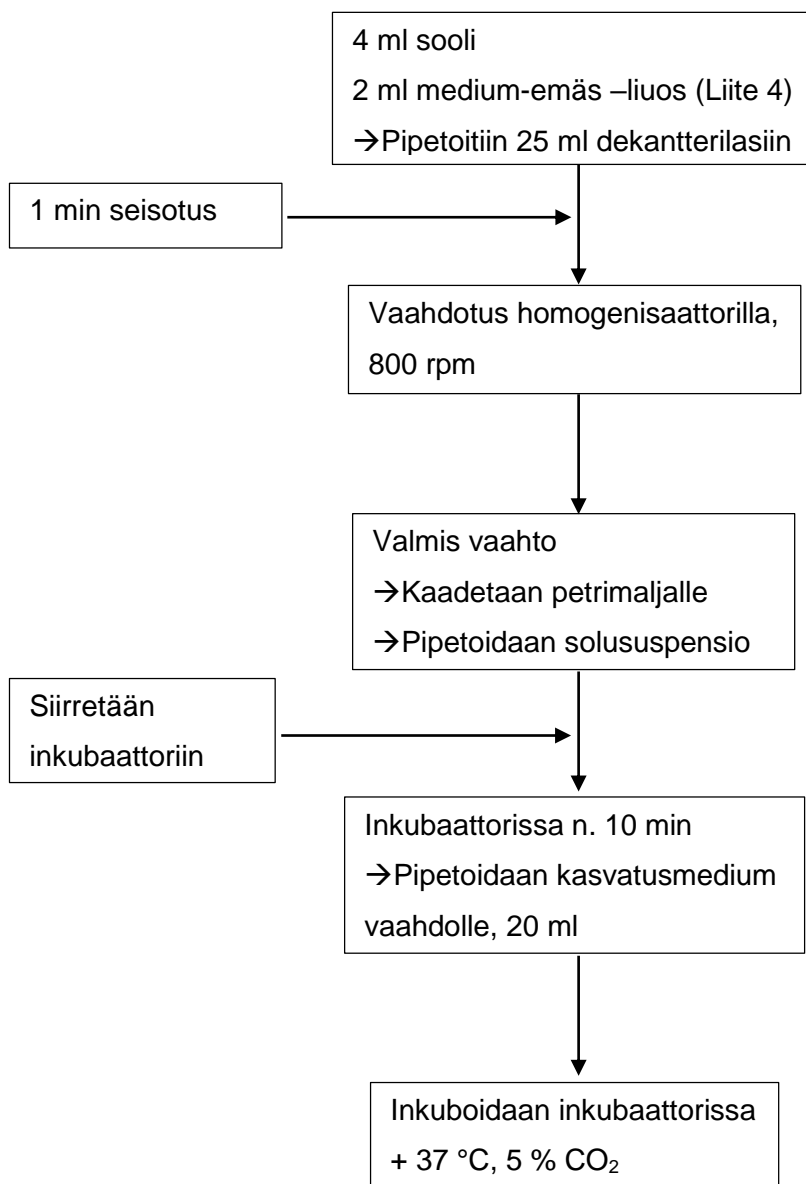
Reseptit

R-arvo	Tilavuus	V (TEOS)	V (H ₂ O)	V (HCl)	V (EtOH)	m (SiO ₂)
	ml	ml	ml	ml	ml	g
50	100	20,0	80,0	1,0	20,9	5,34
90	100	12,0	87,0	1,0	12,7	3,26

Soolin valmistusprosessi



Vaahtojen valmistusprosessi



Käytettyjen liuosten koostumukset

Kasvumedium

1000 ml RPMI-1640 (1x), Gibco, alkuperä: Iso-Britannia, luettelonumero 52400

100 ml FBS, Gibco, Etelä-Amerikka, alkuperä: Brasilia, luettelonumero: 10270

10 ml Pen-Strep, Lonza, luettelonumero 17-602E

Medium-emäs -liuos

40 ml RPMI-1640 (1x), Gibco, alkuperä: Iso-Britannia, luettelonumero 52400

4 ml FBS, Gibco, Etelä-Amerikka, alkuperä: Brasilia, luettelonumero: 10270

900 µl NaOH, 1 M